

Cromatografia

Hana Sousa



1 Introdução

A cromatografia é uma técnica de separação de misturas muito ampla, já que pode ser realizada de várias maneiras. Além de ser útil para a separação de componentes, também permite identificá-los.

Diferentemente das destilações ou da catação, é possível que o leitor nunca tenha ouvido falar dessa técnica chamada cromatografia e, por isso, não tenha uma imagem mental desse processo. Uma coisa que posso adiantar é que a cromatografia não tem uma forma definida. Portanto, quando pensamos em cromatografia, podemos imaginar máquinas supermodernas e complicadas ou até mesmo um papel com tinta de caneta e água percorrendo sua superfície por meio da capilaridade.

Para começar o nosso estudo, vamos fazer uma definição:

A cromatografia é uma técnica de separação e identificação de componentes em uma mistura, que se baseia na deposição da mistura em fases móvel e estacionária. O solvente, também conhecido como eluente, é utilizado para arrastar os componentes da mistura com diferentes velocidades.



Figura 1: Essa pode ser a sua ideia mental de cromatografia, mas não será a definitiva

1.1 Fase estacionária e fase móvel

A fase estacionária é a parte imobilizada da cromatografia, que geralmente assume a forma de uma superfície plana ou de uma coluna. Já a fase móvel é a parte que se movimenta através da fase estacionária, transportando a mistura de componentes. Para que essa movimentação seja possível, a fase móvel pode ser gasosa, líquida ou fluido supercrítico.

Os componentes da mistura interagem com as fases móveis e estacionária diferentemente. Essas interações dependem da natureza desses componentes, da natureza das fases estacionária e móvel, além da temperatura. Lembre-se! Estamos falando de átomos e moléculas, essas partículas têm bastante influência das *forças intermoleculares*.

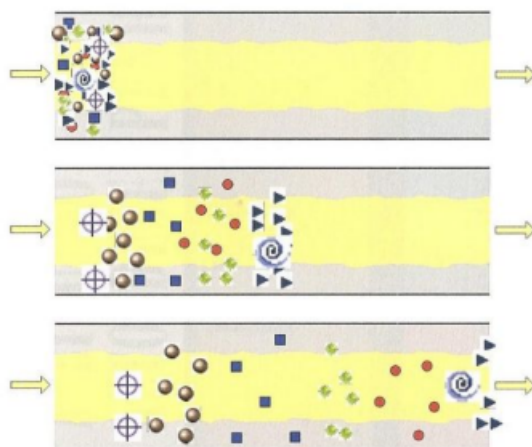


Figura 2: Esquema geral de cromatografias

Uma analogia interessante

Podemos pensar na fase estacionária como o asfalto de uma estrada, nos componentes a serem separados como os veículos que atravessam a estrada e na fase móvel como o combustível desses veículos.

Na figura 2, podemos imaginar carros de modelos diferentes atravessando uma estrada bem cuidada (sem buracos) e com o mesmo combustível. Assim, a diferença entre os veículos cria uma diferença de velocidade, que nos permite identificá-los.

2 Classificação das diferentes cromatografias

Para resumir nosso estudo, vamos classificar as diferentes cromatografias.

| Mecanismo de separação | Natureza da parte móvel | Fluxo da parte móvel |
|------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1. Adsorção | 1. Líquido | 1. Planar |
| 2. Partição | 2. Gás | 2. Ascendente (capilaridade) |
| 3. Exclusão | 3. Fluido supercrítico | 3. Descendente (coluna) |
| 4. Troca iônica | | |

2.1 Mecanismos de separação

O mecanismo da adsorção depende da polaridade das partículas e ocorre quando os componentes são adsorvidos na fase estacionária.

O mecanismo da partição ocorre quando um componente é solubilizado pela fase estacionária. Por isso, depende da solubilidade das substâncias envolvidas.

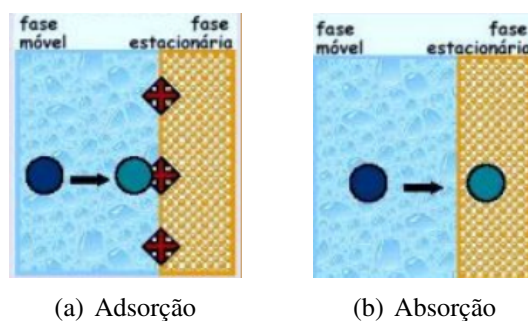


Figura 3: Esquema dos diferentes mecanismos de separação - parte 1

O mecanismo da exclusão ocorre quando as partículas são separadas pelo tamanho. Nesse caso, partículas menores são *aprisionadas* pela fase estacionária e as partículas maiores atravessam mais rapidamente a fase móvel.

o mecanismo da troca-iônica ocorre quando resinas iônicas, ou seja, aquelas que apresentam partículas positivas e negativas são utilizadas como fase estacionária. Assim, a resina troca suas partículas mais vulneráveis com a mistura. Para manter o equilíbrio das cargas, um cátion é sempre trocado por um cátion e assim por diante. Esse método é bastante útil para retirar cátions metálicos de soluções (ver primeira questão da OBQ fase IV 2020).

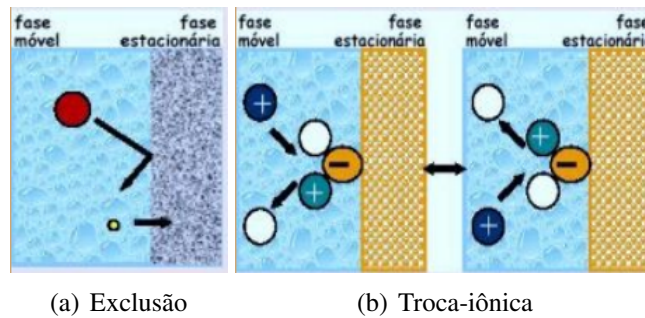


Figura 4: Esquema dos diferentes mecanismos de separação - parte 2

3 Principais técnicas cromatográficas

| Cromatografia | Fase estacionária | Fase móvel |
|-----------------------------|----------------------------|------------|
| em camada delgada | sólida (sílica ou alumina) | líquida |
| em coluna | sólida (sílica ou alumina) | líquida |
| em papel | líquida ¹ | líquida |
| líquida de alta performance | sólida (sílica) | líquida |
| gasosa | sólida ou líquida | gasosa |

Tabela 1: Quadro-resumo das principais técnicas cromatográficas

3.1 Cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada utiliza como suporte uma folha de vidro, metal ou plástico coberta com uma fina camada² de adsorvente, como sílica ou alumina. Além disso, sua fase móvel é um solvente líquido.



Figura 5: Cromatografia de camada delgada

Um esquema para a cromatografia de camada delgada pode ser:

3.1.1 Desenvolvimento da técnica

A partir de agora, descreveremos o processo que um analista performaria em um laboratório. Se o leitor quiser acompanhar por meio de vídeos, aqui estão algumas sugestões:

²Perceba que, camada delgada é o mesmo que camada fina!

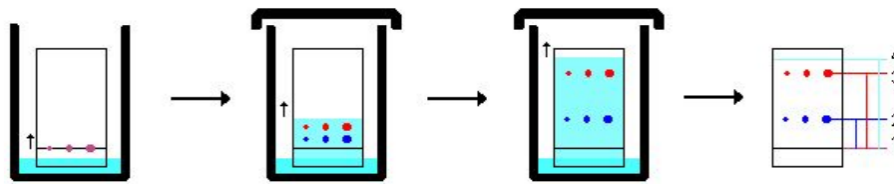


Figura 6: Cromatografia de camada delgada - esquema

- Cromatografia de camada delgada 1
- Cromatografia de camada delgada 2
- Cromatografia de camada delgada 3

1. Preparando o recipiente com o eluente

Em um recipiente transparente com tampa, como um conjunto béquer mais vidro de relógio ou cuba cromatográfica, adicionamos o eluente apropriado até uma altura menor que $0,5\text{cm}^3$ e fechamos o recipiente com a tampa. É necessário deixar o eluente evaporar dentro da cuba cromatográfica para saturar a atmosfera com essa substância e não deixá-lo evaporar durante o desenvolvimento da cromatografia.



(a) Béquer e vidro de relógio (b) Cuba Cromatográfica

Figura 7

2. Preparando a placa cromatográfica

³Esse valor é arbitrário, o importante é ser uma quantidade razoável de eluente.

A depender da placa cromatográfica disponível, será necessário prepará-la, cortando-a no tamanho apropriado para o experimento.

Após o recorte, marcaremos com lápis duas linhas horizontais, que servirão como *linha de origem* e *linha de chegada*. Na linha de chegada, marcaremos um ponto (*spot*) para cada mistura a ser analisada. Esses spots devem ser separados o bastante das bordas da placa e entre si, para que não haja confusão entre misturas na análise.

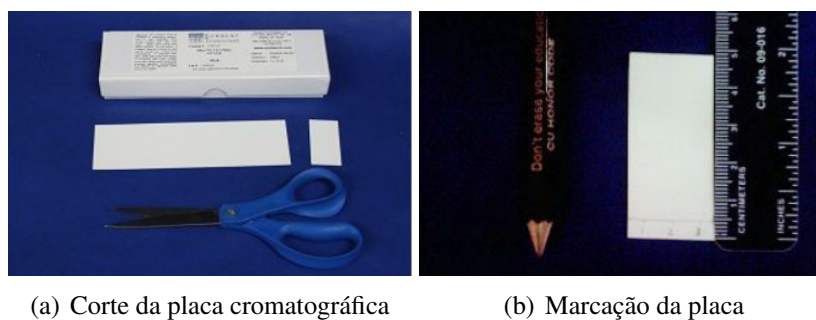


Figura 8

3. Aplicação da mistura na placa

Com um tubo capilar, retiramos parte da amostra e aplicamos gentilmente nos spots indicados para cada mistura na placa cromatográfica.

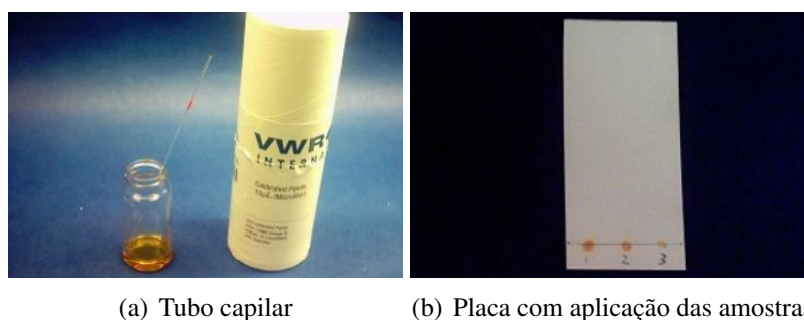


Figura 9

4. Desenvolvimento da placa cromatográfica

Após a marcação e aplicação, colocamos a camada na cuba cromatográfica, de forma que o solvente ascenda uniformemente pela placa. Devido às diferenças de interação, a mistura é separada nesse processo.

Quando o solvente chega à linha de chegada, a camada deve ser retirada da cuba cromatográfica. É importante que não deixar o solvente chegar até o final da placa. Isso ocorre porque se dois componentes diferentes chegam ao fim da placa, não teremos como avaliar quem chegou primeiro.

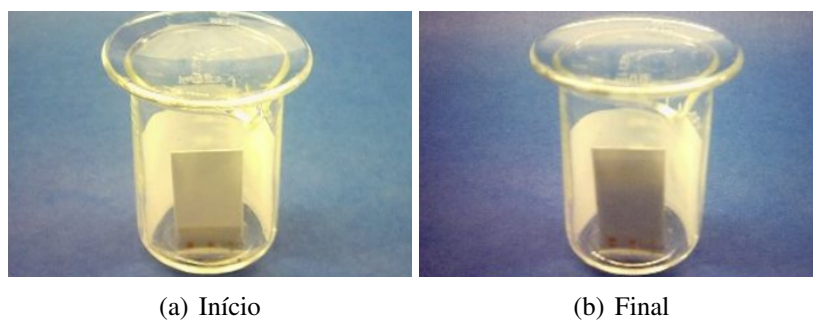


Figura 10

Observação

O solvente não deve cobrir os pontos de aplicação, para que a mistura contida nos spots se dissolva no eluente e não ascenda pela camada cromatográfica.

5. Visualizando os spots (Revelação dos cromatogramas)

Alguns analitos são coloridos, por isso, podemos acompanhar a separação dos componentes sem outros processos. Porém, é muito comum que os solutos sejam incolores. Para tornar as bandas visíveis, podemos utilizar várias técnicas e reagentes, como luz ultravioleta e iodo.

Após revelar as bandas, estas devem ser marcadas com lápis.

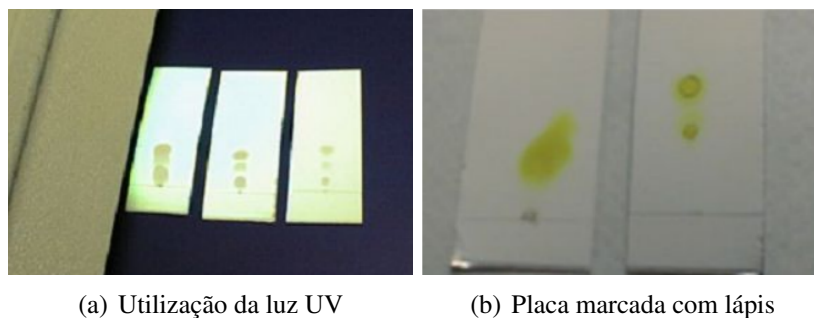


Figura 11

3.1.2 Analisando a diferença de velocidade

A retenção dos componentes na fase estacionária depende da intensidade das interações entre a fase estacionária e a substância. Quanto mais forte a interação, mais retida será a substância e mais lentamente ela se moverá através da coluna. Por outro lado, quanto mais solúvel na fase móvel a substância for, menos retida ela será e mais rapidamente atravessará a coluna.

Geralmente, as fases estacionárias possuem forte afinidade por substâncias polares, o que significa que substâncias polares são fortemente retidas, enquanto substâncias apolares são mais facilmente carregadas pela fase móvel. Um solvente ideal é aquele que dissolve bem todos os componentes da amostra, o que torna a interação entre analito e adsorvente o fator mais decisivo para a eficácia da separação.

Assim, podemos concluir que, em adsorventes polares, substâncias polares se movem mais lentamente e substâncias apolares se movem mais rapidamente.

Em alguns casos, pode ser necessário controlar a velocidade da separação ajustando a polaridade dos solventes. Se todos os componentes se movem lentamente, isso pode indicar que estão fortemente retidos na fase estacionária e são altamente polares. Nesse caso, é possível melhorar a interação com a fase estacionária usando um solvente mais polar.

Por outro lado, se todos os componentes se movem rapidamente, isso pode indicar que são pouco retidos pela fase estacionária e são pouco polares. Nesse caso, é possível ajustar a polaridade do solvente para diminuir a velocidade de separação, usando um solvente menos polar.

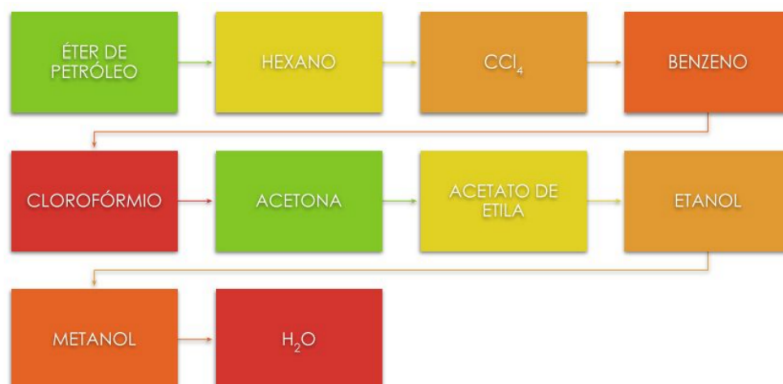


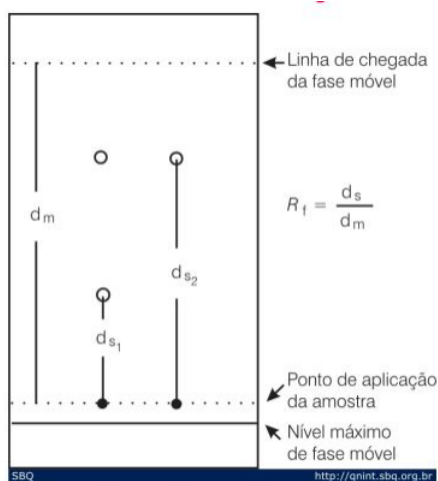
Figura 12: Polaridade crescente dos eluentes

O sistema ideal de eluição é *simplesmente* aquele que nos dá a melhor *separação*, ou seja, aquele que nos permite observar melhor as diferentes bandas, após o desenvolvimento da cromatografia.

3.1.3 Fator de retenção

Em cromatografia de camada delgada (CCD), o fator de retenção (R_f) é a razão entre distância percorrida pelo soluto e distância percorrida pelo solvente após a *linha de partida*.⁴

⁴Lembre-se das marcações que fizemos na camada cromatográfica!



$$R_f = \frac{D}{L} = \frac{\text{distância percorrida pelo soluto}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

Figura 13: Cálculo do fator de retenção

O fator de retenção é constante para um dado experimento e serve para identificar os diferentes componentes. Em outros experimentos de CCD o R_f só continua constante, se permanecerem constantes:

1. o sistema de solvente;
2. o adsorvente;
3. a espessura da camada de adsorvente;
4. a quantidade de material aplicado;
5. e a temperatura.

Não confunda a origem com o nível máximo da fase móvel!

E por hora, terminamos nossa aventura pela cromatografia de camada delgada.

3.2 Cromatografia de coluna

A cromatografia de coluna é aquela que utiliza materiais adsorventes dispostos em uma coluna como suporte. Nesse caso, os componentes atravessam a coluna ao serem carregados pelo eluente. Além disso, a escolha de solventes é muito parecida com a cromatografia de camada delgada.

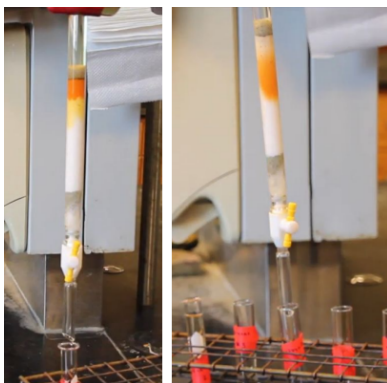


Figura 14: Cromatografia de coluna

Um esquema para a cromatografia de coluna pode ser:

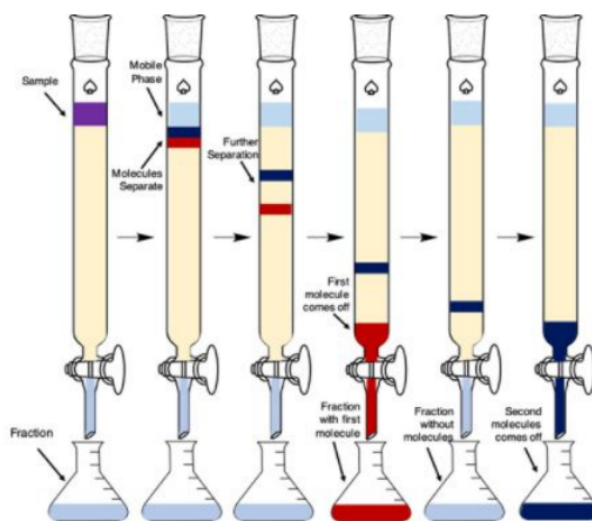


Figura 15: Cromatografia de coluna - esquema

3.2.1 Desenvolvimento da técnica

Assim como no caso anterior, faremos a descrição da prática mas também deixaremos sugestões de vídeos para o leitor acompanhar.

- [Cromatografia de coluna 1](#)
- [Cromatografia de coluna 2](#)

1. Preparando a coluna de cromatografia

Em uma bureta, colocamos um pequeno pedaço de algodão que não permitirá a passagem de sólidos para a toneira. Depois, adicionamos uma camada de areia, que servirá de suporte para a fase estacionária. O próximo passo é inserir a sílica com o eluente cuidadosamente para evitar bolhas (lembre-se que a estrada não pode ter buracos, para avaliarmos o carro mais rápido). O solvente deve estar na altura da sílica, mas não podemos deixar a coluna secar, para evitar imperfeições na fase estacionária.



Figura 16: Coluna montada

2. Introdução da amostra

Introduzimos a amostra no topo da coluna em movimentos circulares e então, colocamos 1 cm de areia no topo da coluna para proteger a sílica de perturbações durante a adição de eluente.



Figura 17: Amostra adicionada

3. Eluição

Como a coluna não pode secar, a adição de eluente deve ser feita constantemente. Nesse caso, O mesmo eluente pode ser utilizado durante todo o processo, ou pode haver uma mudança gradual dos eluentes.

Para agilizar a eluição, podemos utilizar uma bomba de pressão.⁵

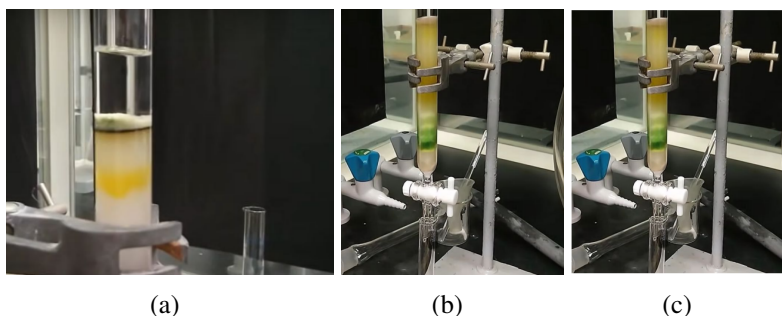


Figura 18: Desenvolvimento da coluna cromatográfica

4. Detecção dos componentes

A coleta do líquido que sai da coluna é feita em tubos de ensaio, que constituirão várias frações. Novamente, se os componentes forem coloridos, poderemos acompanhar visualmente a separação dos mesmos. Porém, se os compostos forem invisíveis, podemos realizar a cromatografia em camada delgada para identificar os componentes em todas as frações.

⁵Utilizando a hidrostática ao nosso favor :D

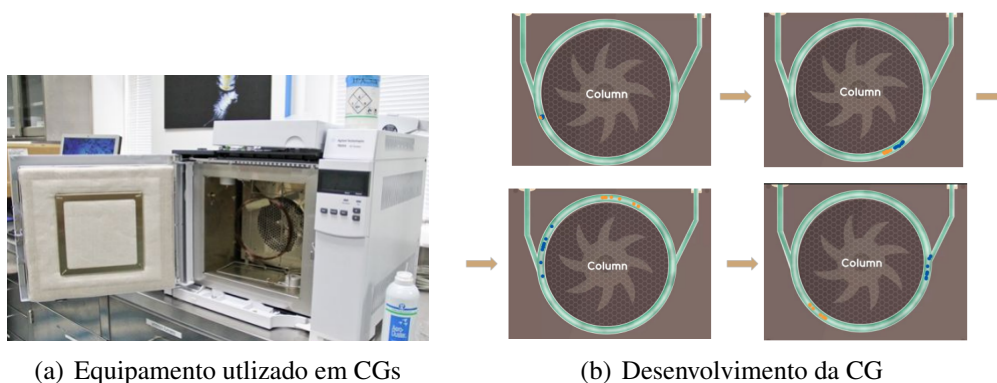


Figura 19: Frações coletadas em tubos de ensaio

Chegamos ao fim de mais um método de cromatografia! Eba!

3.3 Cromatografia gasosa

Na cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada em uma coluna cromatográfica, onde é separada em seus componentes individuais com base em suas diferenças na interação com uma fase estacionária. O gás de arraste, que é normalmente hélio, é utilizado para transportar a amostra pela coluna. À medida que os componentes da amostra passam pela coluna, eles interagem com a fase estacionária e são separados com base em suas diferenças de afinidade. Nesse caso, os compostos devem ser vaporizados sem sofrerem decomposição.



(a) Equipamento utilizado em CGs

(b) Desenvolvimento da CG

Figura 20

4 Cromatogramas

Cromatogramas são gráficos de sinal vs tempo na cromatografia. Nesses gráficos, os picos indicam a passagem de um componente pela fase estacionária.

O parâmetro diretamente mensurável de retenção de um analito é o **tempo de retenção ajustado**, t'_R .

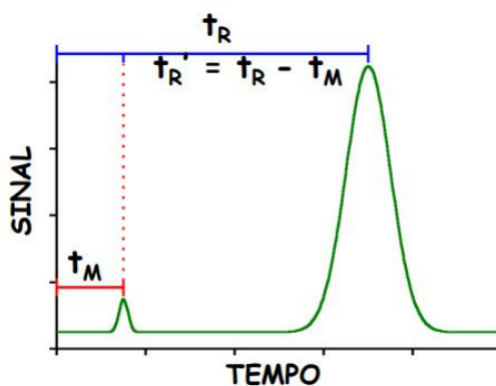


Figura 21

- t_R = Tempo de retenção (tempo decorrido entre a injeção e o ápice do pico cromatográfico).
- t_M = Tempo de Retenção do Composto Não-Retido (tempo mínimo para um composto que não interaja com a fase estacionária atravessar a coluna) (Tempo Morto).
- t'_R = Tempo de Retenção Ajustado (tempo médio que as moléculas do analito passam sorvidas na fase estacionária).

A partir dos cromatogramas, é possível avaliar outros parâmetros, como eficiência, resolução e seletividade.

A **eficiência** é a capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito. Como toda migração de um analito pela fase estacionária provoca um alargamento da banda, é preferível que esse efeito seja reduzido, para uma melhor análise. Assim, uma maior eficiência significa bandas menos largas.

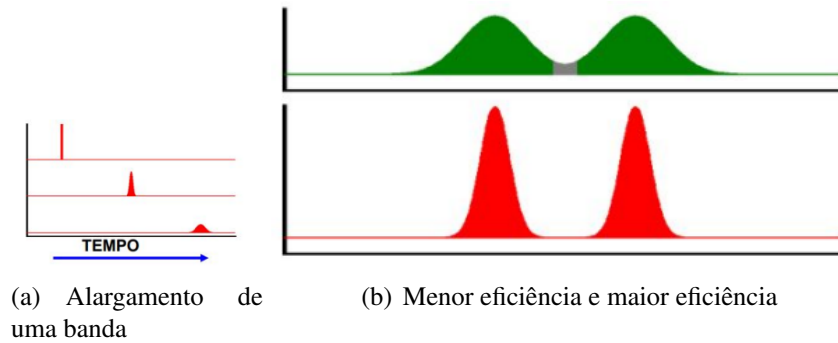


Figura 22

A **resolução** expressa a separação efetiva entre dois picos adjacentes. Assim, uma boa resolução acontece quando os picos estão devidamente separados.

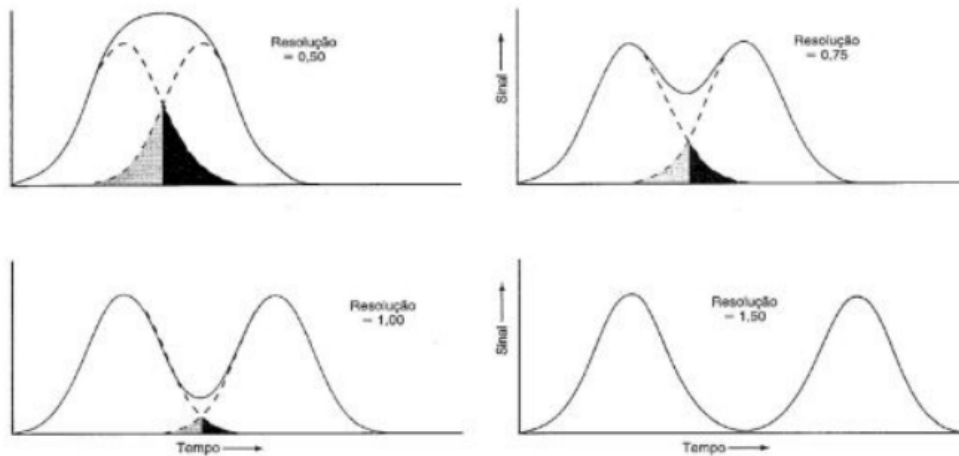
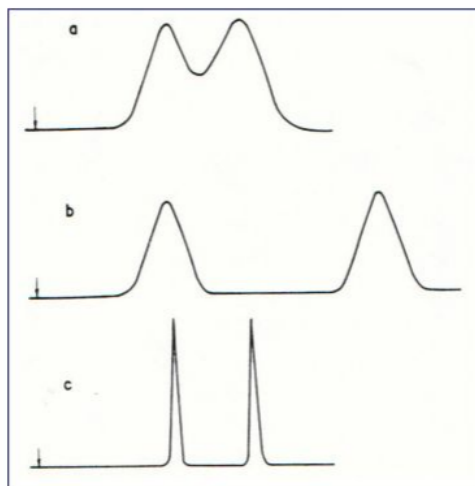


Figura 23: Resolução

Já a **seletividade** diz respeito à medida de tempo ou da distância entre dois picos. Assim, uma boa seletividade ocorre quando os picos estão separados razoavelmente.



Cromatogramas ilustrando a relação entre resolução, seletividade e eficiência

- | | | |
|-----------------|------------------|------------------|
| a) má resolução | b) boa resolução | c) boa resolução |
| má seletividade | boa seletividade | boa seletividade |
| má eficiência | má eficiência | boa eficiência |

Figura 24: Comparando cromatogramas

5 O fim

Finalmente, chegamos ao fim de mais uma aventura dentro da química analítica. Não se engane, caro(a) leitor(a), essa é apenas a ponta do *iceberg* de cromatografia, mas já é uma boa estrutura para encarar os problemas de olimpíadas científicas no Brasil e no mundo.

Com base nesses conceitos, é possível entender como utilizar a cromatografia após uma síntese orgânica para separar os produtos ou para identificar os compostos de plantas como o espinafre.